

JP 62195387

New cytostatic conjugates of vinca alkaloid(s) - with proteins or protein fragments, and new intermediates

Patent Assignee: LA REGION WALLONNE; OMNICHEM SA

Inventors: HANNART J A A; RAO K S B; TROUET A B L

Patent Family (11 patents, 21 countries)							
Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Update	Type
AU 198666537	A	19870618	AU 198666537	A	19861215	198731	B
EP 232693	A	19870819	EP 1986870179	A	19861203	198733	E
LU 86212	A	19870724	LU 86212	A	19851216	198736	E
			LU 86515	A	19860716		
PT 83896	A	19870819				198737	E
JP 62195387	A	19870828	JP 1986299788	A	19861216	198740	E
ZA 198609320	A	19870610	ZA 19869320	A	19861210	198740	E
DK 198605879	A	19870617				198802	E
HU 45264	T	19880628				198831	E
DD 262998	A	19881221				198921	E
US 4828831	A	19890509	US 1986940974	A	19861212	198922	E
US 5030620	A	19910709	US 1989309478	A	19890213	199130	E

Priority Application Number (Number Kind Date): LU 86212 A 19851216; LU 86515 A 19860716

Patent Details					
Patent Number	Kind	Language	Pages	Drawings	Filing Notes
AU 198666537	A	EN	38	0	
EP 232693	A	FR			
Regional Designated States, Original	AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE				
LU 86212	A	FR			
ZA 198609320	A	EN			
US 4828831	A	EN	13		

Alerting Abstract: AU A

A conjugate of a vinca alkaloid with a protein or protein fragment having the formula (A) is new. R1 is a protein or protein fragment; R2 is -COO(1-3C alkyl) or -CO-R7 where R7 is NH2 or an amino acid ester or peptide ester; R3 is H, CH3 or CHO; R6 is H and one of R4 and R5 is C2H5 and the other is H or OH, or R5 and R6 together with the adjacent C atoms form an oxirane ring and R4 is C2H5; A is a bifunctional organic derivative of the maleoylamino acid or maleoyl peptide or maleoyl-phenoxy type.

USE - Cpds. (A) have cyto static activity, and esp. have use in human therapy. Compsns. contg. them, esp. for parenteral use, are conventional. (A) may be used in combination with other antitumour agents.

Equivalent Alerting Abstract:

US A

Vinca alkaloid conjugates with proteins or protein fragments have a formula (I). In (I), R1 is a protein or protein fragment obtd. by digestion of a protein with a proteolytic enzyme, bonded to C through -S or -NH links; R2 is (1-3C alkoxy) carbonyl or -CO-R7, where R7 is NH2 or an aminoacid or peptide gp; R3 is H, Me or CHO; R6 is H and R4 (or R5) is Et and R5. (or R4) is H or OH; or R5 and R5 together complete an oxirane ring and R4 is Et; and A is 1-12C n-alkylene, 2-5C branched lakylene, 3-6C cyclo alkylene, the gp. -CH(R) of a natural aminoacid of formula R-CH(NH2) -COOH, or a peptide fragment. Pref. the protein or protein fragment is a monoclonal immunoglobulin having immunising activity.

USE - Cpds. (I) are therapeutics for cancer, leukemia, etc. with minimised side effects. (13pp)c

US A

Vinblastine deriv. has formula (I) and opt. comprises its racemic or optically active form. R2 is COO(1-3C) alkyl, or COR7; R7 is NH2, amino acid esterifying gp; or peptide esterifying gp; R3 is H, Me or CHO; R6 is H, and R4 or R5 is Et and the other H or OH, or R5 and R6 together form an oxirane ring, and R4 is Et; and x is (1-12C) linear alkylene, (2-5C) branched alkylene, (3-6C) cycloalkylene, or natural amino acid derived gp.

USE - Has cytostatic activity in treatment of cancer, having reduced side effects. (12pp)

International Patent Classification

IPC	Level	Value	Position	Status	Version
A61K-0031/475	A	I	L	R	20060101
A61K-0038/00	A	I	L	R	20060101
A61K-0039/00	A	I	L	R	20060101
A61K-0047/48	A	I		R	20060101
A61P-0035/00	A	I	L	R	20060101

C07D-0519/04	A	I		R	20060101
C07K-0001/113	A	I	L	R	20060101
C07K-0014/00	A	I	L	R	20060101
C07K-0014/76	A	I	F	R	20060101
C07K-0016/00	A	I	L	R	20060101
A61K-0031/475	C	I	L	R	20060101
A61K-0038/00	C	I	L	R	20060101
A61K-0039/00	C	I	L	R	20060101
A61K-0047/48	C	I		R	20060101
A61P-0035/00	C	I	L	R	20060101
C07D-0519/00	C	I		R	20060101
C07K-0001/00	C	I	L	R	20060101
C07K-0014/00	C	I	L	R	20060101
C07K-0014/435	C	I	F	R	20060101
C07K-0016/00	C	I	L	R	20060101

US Classification, Issued: 424085910, 424085800, 435068100, 530362000, 530363000, 530388800, 530389700, 530391900, 530807000, 530812000, 530828000, 530864000, 530866000, 514018000, 514019000, 514283000, 530330000, 530331000, 540478000

Original Publication Data by Authority

Australia

Publication Number: AU 198666537 A (Update 198731 B)

Publication Date: 19870618

Assignee: OMNICHEM SA (SOOM) OMNICHEM SA (SOOM)

Inventor: HANNART J A A TROUET A B L RAO K S B

Language: EN (38 pages, 0 drawings)

Application: AU 198666537 A 19861215 (Local application)

Priority: LU 86212 A 19851216 LU 86515 A 19860716

Original IPC: A61K-31/47 A61K-37/02 A61K-39/44 A61K-47/00 C07D-461/00 C07D-519/04 C07K-13/00 C07K-15/12

Current IPC: A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07D-519/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07D-519/04(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

German Democratic Republic

Publication Number: DD 262998 A (Update 198921 E)

Publication Date: 19881221

Language: DE

Priority: LU 86212 A 19851216 LU 86515 A 19860716

Current IPC: A61K-31/475(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61K-31/475(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61K-38/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61K-38/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61K-39/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61K-39/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) A61P-35/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61P-35/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) C07D-519/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07D-519/04(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-1/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) C07K-1/113(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) C07K-14/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) C07K-14/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) C07K-14/435(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,F) C07K-14/76(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,F) C07K-16/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) C07K-16/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L)

Denmark

Publication Number: DK 198605879 A (Update 198802 E)

Publication Date: 19870617

Language: DA

Priority: LU 86212 A 19851216 LU 86515 A 19860716

Current IPC: A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07D-519/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07D-519/04(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

European Patent Office

Publication Number: EP 232693 A (Update 198733 E)

Publication Date: 19870819

****Konjugate des Vinblastins und seiner Derivate, Verfahren zu deren Herstellung und diese enthaltende Arzneimittel Conjugates of vinblastine and its derivatives, process for their preparation and pharmaceutical compositions containing them Conjugues de la vinblastine et de ses derives, procede pour leur preparation et compositions pharmaceutiques les contenant****

Assignee: OMNICHEM Societe anonyme, 12 Avenue de Broqueville, B-1050 Bruxelles, BE (SOOM) LA REGION WALLONNE (WALL-N)

Inventor: Hannart, Jean Alfred, 25, Avenue D'El Pirere, B-1302 Dion-Valmont, BE Trouet, Andre Benoit Leon, 29, Predikherenberg, B-3009 Winksele, BE Rao, Kandukuri Sivaprasada Bushana, 11, rue Kwakembienne, B-1331 Rosieres, BE

Agent: Van Malderen, Michel, et al, p.a. Freylinger Associes 22 avenue J.S. Bach (bte 43), B-1080 Bruxelles, BE

Language: FR

Application: EP 1986870179 A 19861203 (Local application)

Priority: LU 86212 A 19851216 LU 86515 A 19860716

Designated States: (Regional Original) AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

Original IPC: A61K-31/47 A61K-37/02 A61K-39/44 A61K-47/00 C07D-461/00 C07D-519/04 C07K-13/00 C07K-15/12

Current IPC: A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07D-519/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07D-519/04(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

Claim: A conjugate of a vinca alkaloid with a protein or protein fragment having the formula (A) is new. R1 is a protein or protein fragment; R2 is -COO(1-3C alkyl) or -CO-R7 where R7 is NH2 or an amino acid ester or peptide ester; R3 is H, CH3 or CHO; R6 is H and one of R4 and R5 is C2H5 and the other is H or OH, or R5 and R6 together with the adjacent C atoms form an oxirane ring and R4 is C2H5; A is a bifunctional organic derivative of the maleoylamino acid or maleoyl peptide or maleoyl-phenoxy type.

Hungary

Publication Number: HU 45264 T (Update 198831 E)

Publication Date: 19880628

Language: HU

Priority: LU 86212 A 19851216 LU 86515 A 19860716

Current IPC: A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07D-519/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07D-519/04(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

Japan

Publication Number: JP 62195387 A (Update 198740 E)

Publication Date: 19870828

Language: JA

Application: JP 1986299788 A 19861216 (Local application)

Priority: LU 86212 A 19851216 LU 86515 A 19860716

Current IPC: A61K-31/475(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61K-31/475(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61K-38/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61K-38/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61K-39/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61K-39/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) A61P-35/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61P-35/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) C07D-519/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07D-519/04(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-1/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) C07K-1/113(R,I,M,JP,20060101,20050101,A,L) C07K-14/00(R,I,M,JP,20060101,20050101,A,L) C07K-14/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) C07K-14/435(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,F) C07K-14/76(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,F) C07K-16/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) C07K-16/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L)

Luxembourg

Publication Number: LU 86212 A (Update 198736 E)

Publication Date: 19870724

Language: FR

Application: LU 86212 A 19851216 LU 86515 A 19860716

Current IPC: A61K-31/475(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61K-31/475(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61K-38/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61K-38/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61K-39/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61K-39/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) A61P-35/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61P-35/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L)

C07D-519/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07D-519/04(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)
C07K-1/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) C07K-1/113(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L)
C07K-14/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) C07K-
14/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) C07K-14/435(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,F)
C07K-14/76(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,F) C07K-
16/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) C07K-16/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L)

Portugal

Publication Number: PT 83896 A (Update 198737 E)

Publication Date: 19870819

Language: PT

Priority: LU 86212 A 19851216 LU 86515 A 19860716

Current IPC: A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-
47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07D-519/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07D-
519/04(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

United States

Publication Number: US 4828831 A (Update 198922 E)

Publication Date: 19890509

****New conjugates of vinblastine and its derivatives, process for preparing them and
pharmaceutical compositions containing them****

Assignee: Omnicem

Inventor: Hannart, Jean A. A., BE Trouet, Andre B. L. Rao, Kandukuri S. B.

Agent: Ostrolenk, Faber, Gerb Soffen

Language: EN (13 pages)

Application: US 1986940974 A 19861212 (Local application)

Priority: LU 86212 A 19851216 LU 86515 A 19860716

Original IPC: A61K-39/44 C07K-15/14

Current IPC: A61K-47/48(R,A,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-
47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07D-519/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07D-
519/04(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

Original US Class (main): 42485.91

Original US Class (secondary): 42485.8 43568.1 530362 530363 530388.8 530389.7 530391.9
530807 530812 530828 530864 530866

Original Abstract: A description is given of conjugates of vinca alkaloid of the indole-
dihydroindole type with a protein or a protein fragment, corresponding to the general formula
##STR1## in which R1 denotes a protein or a protein fragment; R2 is COO(C1-3 alkyl) or CO--
R7 where R7 is NH2 or an amino acid ester or peptide ester; R3 is H, CH3 or CHO; when R5
and R6 are taken separately, R6 is H and one of R4 and R5 is ethyl and the other is H or OH;
when R5 and R6 are taken together with the carbon atoms to which they are attached, they form
an oxirane ring and R4 is ethyl, and A is a residue of a bifunctional organic derivative of the
maleoylamino acid or maleoyl peptide or maleoylphenoxy type. [US 5030620 A (Update 199130
E)

Publication Date: 19910709

****Vinblastine derivatives, and pharmaceutical compositions containing them****

Assignee: Omnicem

Inventor: Hannart, Jean A. A., BE Trouet, Andre B. L. Rao, Kandukuri S. B.

Agent: Ostrolenk, Faber, Gerb Soffen

Language: EN

Application: US 1989309478 A 19890213 (Local application)

Priority: LU 86212 A 19851216 LU 86515 A 19860716

Original IPC: A61K-31/475 C07D-519/04

Current IPC: A61K-47/48(R,A,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07D-519/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07D-519/04(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

Original US Class (main): 51418

Original US Class (secondary): 51419 514283 530330 530331 540478

Original Abstract: A description is given of conjugates of vinca alkaloid of the indole-dihydroindole type with a protein or a protein fragment, corresponding to the general formula ##STR1## in which R1 denotes a protein or a protein fragment; R2 is COO(C1-3 alkyl) or CO-R7 where R7 is NH2 or an amino acid ester or peptide ester; R3 is H, CH3 or CHO; when R5 and R6 are taken separately, R6 is H and one of R4 and R5 is ethyl and the other is H or OH; when R5 and R6 are taken together with the carbon atoms to which they are attached, they form an oxirane ring and R4 is ethyl, and A is a residue of a bifunctional organic derivative of the maleoylamino acid or maleoyl peptide or maleoylphenoxy type.

South Africa

Publication Number: ZA 198609320 A (Update 198740 E)

Publication Date: 19870610

Language: EN

Application: ZA 19869320 A 19861210 (Local application)

Priority: LU 86212 A 19851216 LU 86515 A 19860716

Current IPC: A61K-31/475(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61K-31/475(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61K-38/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61K-38/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61K-39/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61K-39/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) A61P-35/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61P-35/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) C07D-519/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07D-519/04(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-1/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) C07K-1/113(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) C07K-14/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) C07K-14/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) C07K-14/435(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,F) C07K-14/76(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,F) C07K-16/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) C07K-16/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L)

Derwent World Patents Index

© 2007 Derwent Information Ltd. All rights reserved.

Dialog® File Number 351 Accession Number 4108171

JP62195387

Title:

**NOVEL BONDED BODY OF VINBLASTINE AND DERIVATIVE OF SAME,
MANUFACTURE AND MEDICINAL COMPOSITION**

Abstract:

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-195387

⑤ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 昭和62年(1987)8月28日

C 07 D 519/04

7822-4C

A 61 K 31/475

ADU

8615-4C ※審査請求 未請求 発明の数 5 (全20頁)

37/02

⑬ 発明の名称 ビンブラスチンおよびその誘導体の新規結合体、その製造方法、並びにそれを含む製剤組成物

⑮ 特 願 昭61-299788

⑯ 出 願 昭61(1986)12月16日

優先権主張 ⑰ 1985年12月16日 ⑱ ルクセンブルグ(LU) ⑲ 86212

⑳ 発 明 者 ジャン アレフレッツ ベルギー国 ベー1302 デイオン ヴアルモン アベニュー
アルフォンス アンデル ビエール 25
ナール

㉑ 発 明 者 アンドレ バンワレ ベルギー国 ベー3009 ウィンクセル プレディクエレン
オン トルエ ベルグ 29

㉒ 出 願 人 オム ニ ケ ム ベルギー国 ベー1150 ブリュッセル アベニュー ド
プロケヴィル 12

㉓ 代 理 人 弁理士 中 村 稔 外5名
最終頁に続く

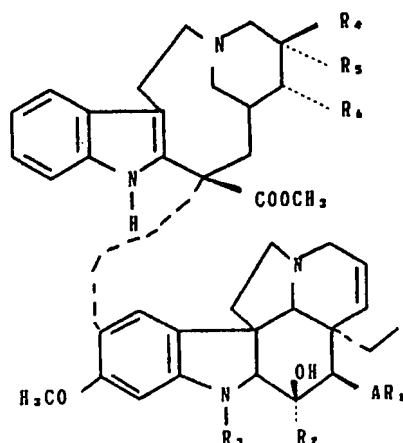
明細書の浄書(内容に変更なし)

明 細 書

1. 発明の名称 ビンブラスチンおよびその誘導体の新規結合体、その製造方法、並びにそれを含む製剤組成物

2. 特許請求の範囲

(1) インドール-ジヒドロインドール型のビンカアルカロイドとタンパク質またはタンパク質フラグメントの結合体であって、一般式：



(式中、

R₁ はタンパク質またはタンパク質フラグ

メントを示し、

R₂ はCOO (C₁-, アルキル) またはCO-R₃、(式中、R₃ はNH₂ またはアミノ酸エステルまたはペプチドエステルである)であり、

R₃ はH、CH₃ またはCHOであり、

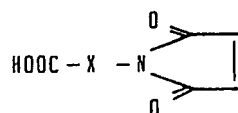
R₄ およびR₅ は別々にされたときにR₄ はHであり、R₄ およびR₅ の1つはエチルであって他はHまたはOHであり、

R₆ およびR₇ はそれらが結合している炭素原子と一緒にしたときにそれらはオキシラン環を形成してR₆ はエチルであり、

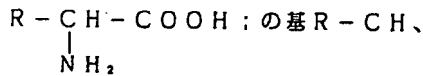
A はマレオイルアミノ酸またはマレオイルペプチドまたはマレオイルフェノキシ型の二官能有機誘導体である)

に相応する結合体。

(2) A が一般式、



〔式中、Xは1～12個の炭素原子の線状アルキレン鎖、2～5個の炭素原子の枝分れアルキレン鎖、3～6個の炭素原子のシクロアルキレン鎖、3～6個の炭素原子のフェニレン鎖、または天然アミノ酸



型-(X)_n-NH-CO)。-X₁ (式中、nは1、2、3または4であり、X₁は1～12個の炭素原子の線状アルキレン鎖2～5個の炭素原子の枝分れアルキレン鎖、3～6個の炭素原子のシクロアルキレン鎖、3～6個の炭素原子のフェニレン鎖、または天然アミノ酸の基R-CHである)のペプチド鎖フラグメント、あるいはフェニル基を示す)、そのラセミ形態またはその光学活性形態の1つに相応する、特許請求の範囲第(1)項記載の結合体。

- (3) XまたはX₁により示される天然アミノ酸の基または基類RCHにより支持された官能性置

イブリドマからの単クローン性Ig;

- ヒト白血病細胞と反応する抗体を分泌するマウスハイブリドマからの単クローン性Ig;
- ヒト神経芽腫細胞と反応する抗体を分泌するマウスハイブリドマからの単クローン性Ig;
- ヒト乳癌と反応する抗体を分泌するマウスハイブリドマからの単クローン性Ig;
- ヒト卵巣癌細胞と反応する抗体を分泌するマウスハイブリドマからの単クローン性Ig;
- ヒト骨肉腫細胞と反応する抗体を分泌するマウスハイブリドマからの単クローン性Ig;

および

-肺癌に対する抗体を分泌するマウスハイブリドマからの単クローン性Ig;

からなる群から選ばれる免疫グロブリン、あるいはタンパク質分解酵素で消化することにより抗体から得られる免疫グロブリンフラグメント、すなわち、Fab、Fab'またはF(ab')₂、あるいはモノマーIgMである、特許請求の範囲第(1)項～第(5)項のいずれか一項に記載の結合体。

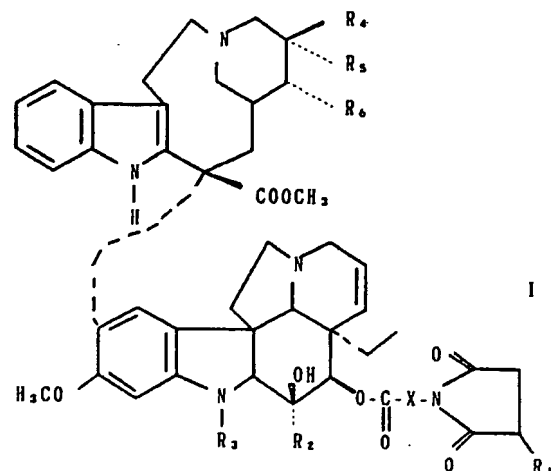
換基が公知保護基により保護されている、特許請求の範囲第(1)項記載の結合体。

- (4) タンパク質R₁がウシまたはヒト血清アルブミンあるいはフェチユインまたは免疫グロブリンである、特許請求の範囲第(1)項～第(3)項のいずれか一項に記載の結合体。

- (5) タンパク質R₁が選択的に処理される、特許請求の範囲第(1)項～第(4)項のいずれか一項に記載の結合体。

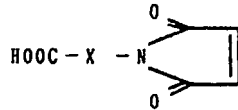
- (6) R₁が
- 癌胎児性抗原で免疫したヤギまたはヒツジのIg;
 - ウサギ抗-L L A Ig;
 - 種々のサル抗L L A、抗L M A、抗L L C、抗L M C Ig;
 - 肺の癌腫の膜で免疫したヤギまたはヒツジのIg;
 - ヒト結腸直腸癌腫に対する抗体を分泌するマウスハイブリドマからの単クローン性Ig;
 - ヒト黒色腫に対する抗体を分泌するマウスハ

- (7) ビンカアルカロイドとタンパク質またはタンパク質フラグメントとの、式(1)

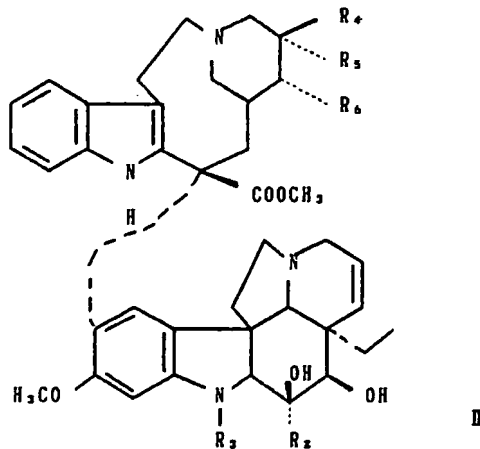


(式中、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆およびXは特許請求の範囲第(1)項および第(2)項に記載した意味を有する)

に相応する結合体の製造方法であって、式、

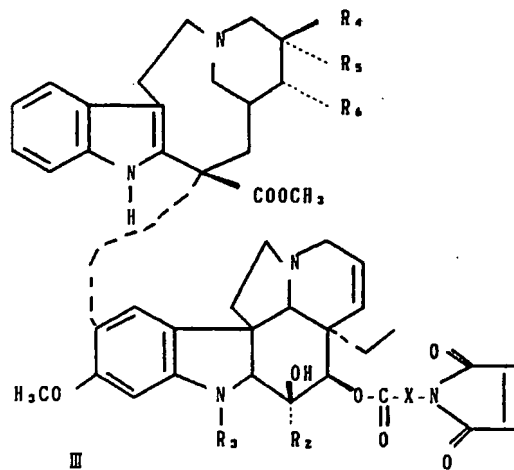


のマレオイルアミノ酸またはマレオイルペプチドを一般式(Ⅱ)、



(式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 および X は前記の意味を有する)

の化合物の C^4 -ヒドロキシルと縮合させ、得られた中間体生成物をタンパク質またはタンパ



(式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 および X は特許請求の範囲第(1)項および第(2)項に記載した意味を有する)

の化合物。

00 活性物質として特許請求の範囲第(1)項～第(6)項のいずれか一項に記載の結合体を、製剤に許容される担体および賦形剤と結合せて、50mg～数gで変化する単位用量に従い、場合により他の活性物質と組合せて含む製剤組成物。

ク質フラグメントと縮合させることを含む方法。

(8) 第1縮合段階がクロロギ酸アルキル、好ましくはクロロギ酸エチルまたはイソプロピル、により、アミン塩基、例えばトリエチルアミン、 N -メチルピペリジンまたは N -メチルモルホリン、の存在下に、有機溶媒例えば酢酸エチル、テトラヒドロフランまたは塩化メチレン中で行なわれ、得られた中間体化合物が反応媒質から分離され、それが精製され、第2縮合段階が常法で水性媒質中で4～25℃の温度および7.5～9.5のpHで行なわれる、特許請求の範囲第(7)項記載の方法。

(9) 中間体化合物として一般式(Ⅲ)、

00 特許請求の範囲第(1)項～第(6)項のいずれか一項に記載の結合体を、製剤に許容される溶媒例えば生理食塩水またはリン酸塩緩衝液により緩衝された溶液中に溶解した状態で含む、特許請求の範囲第00項記載の製剤組成物。

02 特許請求の範囲第(1)項～第(6)項のいずれか一項に記載の結合体の、抗腫瘍および細胞増殖抑制活性を有する薬剤の製造に対する使用。

3. 発明の詳細な説明

本発明はインドール・ジヒドロインドール型のピンカアルカロイドとタンパク質またはタンパク質フラグメントとの、医薬特性、殊に細胞増殖抑制活性を有する新規結合体に関する。インドール・ジヒドロインドール型のピンカアルカロイド、殊にビンブラスチン、ビンクリスチンおよびビンデシンは癌の治療に使用される。しかし、これらの誘導体の化学療法使用はそれらの副作用によりその有効性が限定される。このため、これらの副作用を低下するために多くの誘導体が合成された。

ビンブラスチンおよびその誘導体の若干、殊にビンクリスチンまたはビンデシンが既にタンパク質例えばアルブミンまたは種々の免疫グロブリンに結合された。これは結合体 (conjugate) として知られるカップリング生成物または化合物を生ずる。

発明者は殊に次の参考文献を文献中に認める：

チールほか (J. D. Teale, Jacqueline M. Clough and V. Marks), ブリテイッシュ・ジャ

コンラッドほか (R. A. Conrad, G. J. Cullinan, K. Gerzon and G. A. Poore), ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー (J. Med. Chem.), 22, 391, 1979、

リリー (Eli Lilly), 英国特許願公表第 2,137,210 号 (03. 11. 84)、

オムニケム (Omnichem), 欧州特許願公表第 124,502 号 (07. 11. 84)。

これらのインドール・ジヒドロインドール二量体のカップリングは新免疫試薬の開発目的のみでなく、また殊に一層選択的で低毒性である一層活性な抗腫瘍物質を製造する目的に試みられた。

これまでに2つの型のカップリングが意図された：

- アジ化物誘導体を経る C³ におけるカップリング (欧州特許願公表第56,322号)、
- ピンカアルカロイド骨格の炭素4上のヒドロキシル基から誘導されたエステル基を経由する C⁴ におけるカップリング (英国特許願公表第 2,137,210 号; 欧州特許願第 124,502号)。

ーナル・オブ・クリニカル・ファルマコロジー (Br. J. Clin. Pharmac.), 4, 169~172, 1977、

フォードほか (C. H. J. Ford, C. E. Newman, J. R. Johnson, C. S. Woodhouse, T. A. Reeder, G. F. Rowland and R. G. Simmonds), ブリテイッシュ・ジャーナル・オブ・カンサー (Br. J. Cancer), 47, 35~42, 1983、

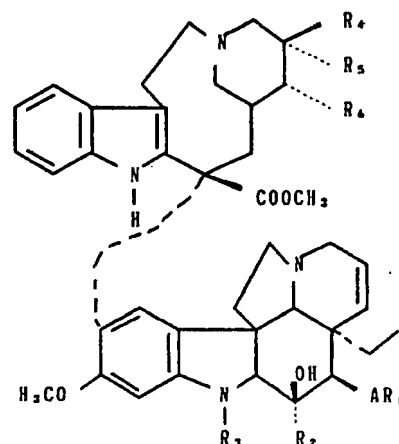
エンブレトンほか (M. J. Embleton, G. F. Rowland, R. G. Simmonds, E. Jacobs, C. H. Marsden and R. W. Baldwin), ブリテイッシュ・ジャーナル・オブ・カンサー (Br. J. Cancer), 47, 43~49, 1983、

ジョンソンほか (J. R. Johnson, C. H. J. Ford, C. E. Newman, C. S. Woodhouse, G. F. Rowland and R. G. Simmonds), ブリテイッシュ・ジャーナル・オブ・カンサー (Br. J. Cancer), 44, 472~475, 1981、

リリー (Eli Lilly), 欧州特許願、公表第56,322号 (21. 07. 82)、

本発明は、カップリングが同様にピンカアルカロイド骨格の炭素4上のヒドロキシル基から誘導されるエステル基を経て行なわれるインドール・ジヒドロインドール型のピンカアルカロイドとタンパク質またはタンパク質フラグメントとの結合体である新規生成物に関する。

より詳しくは本発明の目的は一般式、



(式中、

R₁ はタンパク質またはタンパク質フラグメントを示し、

R_2 は COO ($\text{C}_{1\sim 3}$ アルキル) または CO-R_7

(式中、 R_7 は NH_2 またはアミノ酸エステルまたはペプチドエステルである) であり、

R_3 は H 、 CH_3 または CHO であり、

R_4 および R_5 は別々にされたときに R_4 は H であり、 R_4 および R_5 の 1 つはエチルであって他は H または OH であり、

R_6 および R_7 はそれらが結合している炭素原子と一緒にしたときにそれらはオキシラン環を形成して R_6 はエチルであり、

A はマレオイルアミノ酸またはマレオイルペプチドまたはマレオイルフェノキシ型の二官能有機誘導体の残基である]

に相応するインドール-β-ヒドロインドール型のビンカアルカロイドのタンパク質またはタンパク質フラグメントとの結合体からなる。

これらの結合体において、本発明によればタンパク質またはタンパク質フラグメントは、4-デアセチル-インドール-β-ヒドロインドールビンカアルカロイドと一般式、

X はペプチド鎖のフラグメント

$-(X_1 - \text{NH} - \text{CO})_n - X_1 -$

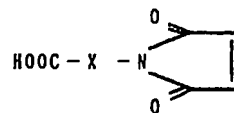
(式中、 $n = 1, 2, 3$ または 4 であり、

X_1 は上記 X と同じ意味を有する) を示す。

$-X$ はまたフェニル基を示すことができる。

上記二官能誘導体が不斉中心を含むとき、それはそのラセミ形態で、またはその光学活性形態の 1 つで使用することができる。

より詳しくは、本発明の結合体は次式により示すことができる：



のマレオイルアミノ酸型またはマレオイルペプチド型の二官能有機誘導体との前縮合による腕を経てビンカ化合物に結合する。

式中、

-マレオイルアミノ酸の場合に、

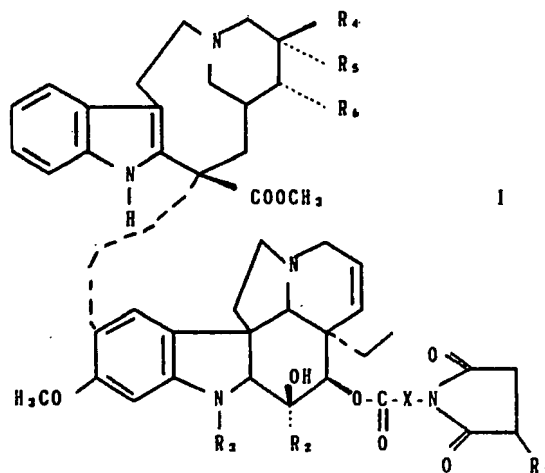
X は 1 ~ 12 個の炭素原子の線状アルキレン鎖、2 ~ 5 個の炭素原子の枝分れアルキレン鎖、3 ~ 6 個の炭素原子のシクロアルキレン鎖、または 3 ~ 6 個の炭素原子のフェニレン鎖を示す。

さらに、二官能誘導体がマレオイルアミノ酸型であるときに X は上記意味に加えて天然アミノ酸 $\text{R} - \text{CH} - \text{COOH}$ の基 $\text{R} - \text{CH}$ を示す。



この最後の場合に基 $\text{R} - \text{CH}$ が官能性置換基をもつときに後者はペプチド合成に普通に使用される保護基により保護されていることができる。

-マレオイルペプチドの場合に、



式中、

R_1 はタンパク質またはタンパク質フラグメントを示し、

X は前記のとおりであり、

R_2 は COO ($\text{C}_{1\sim 3}$ アルキル) または CO-R_7 (式中、 R_7 は NH_2 またはアミノ酸エステルまたはペプチドエステルである) であり、

R_3 は H 、 CH_3 または CHO であり、

R_4 および R_5 は別々にされたときに R_4 は H

であり、 R_4 および R_5 の1つはエチルであって他はHまたはOHであり、

R_2 および R_3 はそれらが結合している炭素原子と一緒にしたときにそれらはオキシラン環を形成して R_4 はエチルである。

上式を有する化合物は一般に、

R_2 が COOCH_3 であり、 R_3 がメチルであり、 R_4 がヒドロキシルであり、 R_5 がエチルであり、 R_6 が水素であるビンブラスチン誘導体、

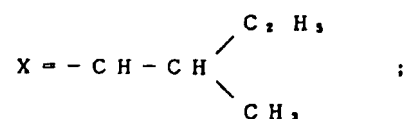
R_2 が CO-NH_2 であり、 R_3 、 R_4 、 R_5 および R_6 がビンブラスチン誘導体に対して記載した意味を有するビンデシン誘導体、

R_2 が CO-R_7 (R_7 はアミノ酸エステルまたはペプチドエステルである)であり、 R_3 、 R_4 、 R_5 および R_6 がビンブラスチン誘導体に対して記載した意味を有する2,3-ビンブラスチノイルアミノ酸誘導体、

R_2 が COOCH_3 であり、 R_3 がホルミルであり、 R_4 がヒドロキシルであり、 R_5 がエチルであり、 R_6 が水素であるビンクリスチン誘導体、

$X = \text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$; α -アミノ酪酸の場合に $X = \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$; パリンの場合に $X = \text{CH}-\text{CH}-(\text{CH}_2)_2$; ノルパリンの場合に $X = \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$; ロイシンの場合に

$X = -\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_2)_2$; イソロイシンの場合に



ノルロイシンの場合に

$X = \text{CH}-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}_3$; 6-アミノカブロン酸の場合に $X = (\text{CH}_2)_5$; 11-アミノウンデカン酸の場合に $X = (\text{CH}_2)_{10}$;

および12-アミノデカン酸の場合に

$X = (\text{CH}_2)_{11}$ である。

マレオイルペプチド型の二官能誘導体もまたN-アルコキシ-マレイミドとジペプチドまたはトリペプチドとの縮合から生ずることができ、誘導体 $-(X_1-\text{NH}-\text{CO}-)_n$ X_1 (式中、 X_1

R_2 が COOCH_3 であり、 R_3 がメチルであり、 R_4 がエチルであり、 R_5 がヒドロキシルであり、 R_6 が水素であるロイロシジン誘導体、

R_2 が COOCH_3 であり、 R_3 がメチルであり、 R_4 および R_5 が水素であり、 R_6 がエチルである4-デオキシ-VLB "A" の誘導体、

R_2 が COOCH_3 であり、 R_3 がメチルであり、 R_4 がエチルであり、 R_5 および R_6 が水素である4-デオキシ-VLB "B" の誘導体および

R_2 が COOCH_3 であり、 R_3 がメチルであり、 R_4 がエチルであり、 R_5 および R_6 が一緒にエポキシド連鎖を形成するロイロシン誘導体、と記載することができる。

マレオイルアミノ酸型の二官能誘導体はN-アルコキシマレイミドとアミノ酸(天然または他の)との縮合から生ずることができ、グリシンとの縮合の場合に $X = \text{CH}_2$; アラニンとの場合に $X = \text{CH}-\text{CH}_2$; β -アラニンとの場合に $X = (\text{CH}_2)_2$; フェニルアラニンとの場合に

は上記Xと同じ意味を有することができる)を与える。

有利に使用できるタンパク質は殊にウシまたはヒト血清アルブミン、あるいはフェチュインまたは免疫グロブリンである。

用いるタンパク質または選択的に変性するために処理することができる。これらの変態は、それらを治療に用いるときに一定組織例えば肝臓に優先的に濃縮されるタンパク質結合体を得ることを可能にする。従って、ビンカアルカロイド誘導体とタンパク質との縮合前に後者をガラクトシル化することができる。

悪性細胞表面抗原に対する特異的免疫グロブリン、および免疫動物の血清から、または単クローン性抗体を分泌するハイブリドーマの培養によりそれらを生成させる技術はよく知られている。本発明における使用に好ましい型の抗体はヒト由来のIgG種の免疫グロブリンである。

しかし、他種の免疫グロブリンもまた本発明に含まれる。若干の代表的な免疫グロブリンは次の

とおりである：

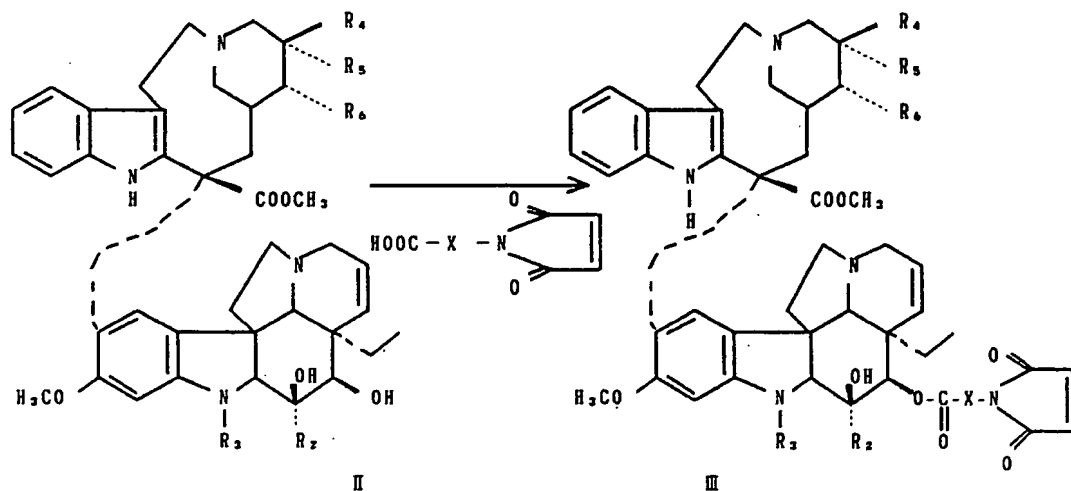
- 癌胎児性抗原で免疫したヤギまたはヒツジのIg；
- ウサギ抗-L L A Ig；
- 種々のサル抗 L L A、抗 L M A、抗 L L C、抗 L M C Ig；
- 肺の癌腫の膜で免疫したヤギまたはヒツジのIg；
- ヒト結腸直腸癌腫に対する抗体を分泌するマウスハイブリドーマからの単クローン性Ig；
- ヒト黒色腫に対する抗体を分泌するマウスハイブリドーマからの単クローン性Ig；
- ヒト白血病細胞と反応する抗体を分泌するマウスハイブリドーマからの単クローン性Ig；
- ヒト神経芽腫細胞と反応する抗体を分泌するマウスハイブリドーマからの単クローン性Ig；
- ヒト乳癌抗原と反応する抗体を分泌するマウスハイブリドーマからの単クローン性Ig；
- ヒト卵巣癌細胞と反応する抗体を分泌するマウスハイブリドーマからの単クローン性Ig；
- ヒト骨肉腫細胞と反応する抗体を分泌するマウスハイブリドーマからの単クローン性Ig；およ

び

- 肺癌に対する抗体を分泌するマウスハイブリドーマからの単クローン性Ig。

結合体はまた、タンパク質分解酵素で消化することにより抗体から得られる免疫グロブリンフラグメント、すなわち、Fab、Fab' または F(ab')₂ フラグメント、あるいはモノマーIgMで製造することができる。

本発明の結合体は第1段階においてマレオイルアミノ酸またはマレオイルペプチドと式IIの4-デアセチル-インドール-3-ヒドロインドールピソカルカロイドのC⁴-ヒドロキシルとを縮合させて式IIIの誘導体を与えることにより得られる：



(式中、 X 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 および R_6 は前記の意味を有する)

第2段階において、4-カルボキシマレオイルビンカ誘導体Ⅲは次いでタンパク質またはタンパク質フラグメントと、タンパク質の遊離チオール基または遊離アミノ基、例えばタンパク質のリシン残基から誘導されるアミノ基のマイクル(Michael)型付加機構(ミーンズほか(Means, G. E. and Peeney, R. E.); タンパク質の化学修飾(chemical modification of proteins), 1971, 110~138頁、ホルデン・デイ社(Holden Day Inc., San Francisco))に従い、マレイミドのオレフィン二重結合に対する付加により縮合させると結合体Ⅰが得られる。

化学的観点によると:

マレオイルアミノ酸またはマレオイルペプチドの製造はケラーほか(K. Keller and J. Rudinger, ヘルベチカ(Helv.), 58, 531 (1975)、リッチほか(D. H. Rich, P. D. Gesselchen, A. Tong, A. Cheung and

殊に、 X がフェニルである場合に、縮合はアルカワ(I. Alkawa), ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 79, 233 (1976)およびオサリバン(M. J. O'Sullivan)ほか、アナリティカル・バイオケミストリー(Anal. Biochem.), 100, 100 (1979)により記載された方法により得られたN-スクシンイミジル3-マレイミド安息香酸エステルで行なわれる。

結合体の製造はタンパク質、多クローン性または単クローン性抗体を式Ⅲのビンカ化合物と、古典的条件下に、例えば水性媒質中、4~40℃の温度で7.5~9.5のpHで反応させることにより行なうことができる。

結合する残基の数は試薬の濃度、および反応時間に依存することができるが、しかし平均数は一般に5~20である。

例えば、化合物Ⅲの有機溶媒例えばジオキサン中の溶液をタンパク質の例えばpH 8.2における0.1 Mリン酸塩緩衝液中の緩衝した溶液に滴下す

C. K. Buckner), ジャーナル・オブ・メデイシナル・ケミストリー(J. Med. Chem.), 18, 1004 (1975)およびサトーほか(A. Sato and M. Nakao), ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 90, 1117 (1981)により記載された方法に従って行なわれる。

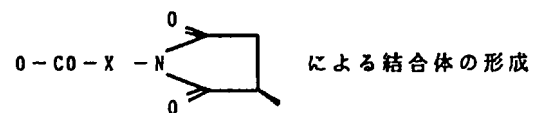
マレオイル誘導体とビンカアルカロイドとの縮合は常法で、クロロギ酸アルキル、好ましくはクロロギ酸エチルまたはクロロギ酸イソブチルで、アミン塩基例えばトリエチルアミン、N-メチルピペリジンまたはN-メチルモルホリンの存在下に有機溶媒例えば酢酸エチル、テトラヒドロフランまたは塩化メチレン中に行なうことができる。

得られた誘導体は反応媒質から分離し、化学に使用される古典的方法により精製する。

ビンカアルカロイドとの縮合を行なうマレオイルアミノ酸またはマレオイルペプチドのカルボキシル基を活性化する任意の他の方法、殊にペプチド化学に使用される方法はこの型の縮合に適用できる。

混合物を室温で一晩置いた後結合体をゲル濾過により分離し、限外濾過により濃縮し、滅菌する。タンパク質含量はローリー(Lowry)法により測定し、アルカロイド含量は放射能の測定により評価される。

本発明の化合物の抗腫瘍活性を示すために行なった「試験管内」および「生体内」試験は、マレオイル連鎖



がO-CO-X-CO-連鎖よりも一層有利であることができることを示す。

実際にマレオイル連鎖はタンパク質またはタンパク質フラグメントの遊離アミノ基およびチオール基の両方の結合を可能にする。さらに、リソソーム酵素による消化はビンカアルカロイドをマレオイル連鎖の場合に非常に高度に遊離することを示す。結合体はまた血清中および酸性pHで安定である。

本発明の化合物を、P388白血病を腹腔内に移植したBDF₁マウスで試験した。最初の結果は、生存時間の増加を誘発するのでこれらの化合物がこの試験モデルに対して有意な活性を示すことを示す。

本発明の新規結合体は殊に有利で、ヒトの療法に使用できる抗腫瘍性を示す。

それらの療法における適用のために、本発明の化合物は好ましくは非経口的に投与され、製剤に許容される溶媒に溶解される。生理食塩水または他の、例えばリン酸塩で緩衝された溶液は適当な溶媒である。活性物質は一般に50mg〜数gで変えることができる用量で投与される。

本発明の化合物はさらに他の抗腫瘍薬と組合せて使用できる。

以下の実施例は限定を意味することなく本発明の化合物を導く方法を例示する。

実施例1:

N-カルボメトキシマレイミド

トリエチルアミン3.8g(0.04モル)および

100mlに濃縮し、1M硫酸の添加によりpH2に酸性化し、酢酸エチルで3回抽出する。有機相を合せて無水硫酸ナトリウム上で乾燥し、真空中に蒸発乾固する。

得られた残留物をシリカカラム上のクロマトグラフィー(溶離:クロロホルム/酢酸、95:5)により精製する。N-マレオイル-L-アラニン1.2gがこの方法で得られる。

収率:48%。

IRスペクトル(KBr) cm^{-1} :

3400, 3100, 2930, 1780, 1740, 1700, 1460,
1420, 1390, 1370, 1345, 1220, 1175, 1118,
1080, 1068, 1015, 970, 835, 700.

NMRスペクトル(CDCl₃, δ):

6.7(2H, s); 4.8(1H, g);
1.65(3H, d)

実施例3:

N-マレオイル-6-アミノカブロン酸

6-アミノカブロン酸4.2g(32.3ミリモル)の飽和炭酸水素ナトリウム溶液163ml中の溶

液に0℃で、酢酸エチル150ml中の溶液に0℃で、酢酸エチル20mlに溶解したクロロギ酸メチル3ml(0.04モル)を添加する。1時間かくはんした後沈殿を濾過し、酢酸エチルで洗浄した。有機相を合せて水で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥し、真空中に蒸発乾固する。

残留物を酢酸エチル/イソプロピルエーテル混合物で結晶化するとN-カルボメトキシマレイミド4.19gが得られる。

NMRスペクトル(CDCl₃, δ):

6.75(2H, s)、3.9(3H, s)。

実施例2:

N-マレオイル-L-アラニン

L-アラニン2.3g(0.025モル)の飽和炭酸水素ナトリウム溶液100ml中の溶液に0℃で激しくかくはんしながらN-カルボメトキシマレイミド3.87g(0.025モル)を加える。

1時間後溶液を水200mlで希釈し、40℃で1時間かくはんする。次いで溶液のpH(8.2)を濃硫酸の添加により6.4にする。次いで溶液を

液に0℃で、激しくかくはんしながらN-カルボメトキシマレイミド5g(32.3ミリモル)を加える。1時間後溶液を水256mlで希釈し、室温で1時間かくはんする。次いで溶液のpH(8.2)を濃硫酸の添加により6.4にする。次いで溶液を100mlに濃縮し、1M硫酸の添加によりpH2に酸性化し、酢酸エチルで3回抽出する。有機相を合せて無水硫酸ナトリウム上で乾燥し、真空中に蒸発乾固する。残留物をシリカカラム上のクロマトグラフィー(溶離:クロロホルム/酢酸、95:5)により精製する。この方法でN-マレオイル-6-アミノカブロン酸4.7gが得られる。収率:51%。

IRスペクトル(KBr) cm^{-1} :

3,090; 2,940; 2,880; 1,770; 1,710;
1,470; 1,450; 1,380; 1,370; 1,340;
1,315; 1,260; 1,210; 1,135; 1,110;
1,140; 1,100; 1,015; 1,000; 815;
840; 735; 700.

実施例4:

N-マレオイル-L-グルタミン酸γ-メチルエステル

L-グルタミン酸1g(6.2ミリモル)の飽和炭酸水素ナトリウム溶液31.2ml中の溶液に0℃で激しくかくはんしながらN-カルボメトキシマレイミド961mg(6.2ミリモル)を加える。1時間後溶液を水126mlで希釈し、40℃で1時間かくはんする。次いで溶液のpH(8.2)を濃硫酸の添加により6.4にする。次いで溶液を50mlに濃縮し、1M硫酸の添加によりpH2に酸性化し、酢酸エチルで3回抽出する。有機相を合わせ無水硫酸ナトリウム上で乾燥し、真空下に蒸発乾固する。得られた残留物をシリカカラム上のクロマトグラフィー(溶離:クロロホルム/酢酸、95:5)により精製する。この方法で純生成物956mgが得られる。

収率:49%。

NMRスペクトル 60:

7.9(s, 酸 H); 6.5(s, マレイミド);

6.85(2, s, マレイミド 二重結合);

4.65(1, d, C*H);

2.6(m, 1, CH); 1.28(d, CH₃);1.1(m, CH₃).

実施例6:

N-マレオイル-L-アスパラギン酸α-ベンジルエステル

L-アスパラギン酸α-ベンジルエステル1g(4.48ミリモル)の飽和炭酸水素ナトリウム溶液22.5ml中の溶液に0℃で、激しくかくはんしながらN-カルボメトキシマレイミド694mg(4.48ミリモル)を加える。

1時間後溶液を水91mlで希釈し、40℃で1時間かくはんする。次いで溶液のpH(8.2)を濃硫酸の添加により6.4にする。次いで溶液を50mlに濃縮し、1M硫酸の添加によりpH2に酸性化し、酢酸エチルで3回抽出する。

有機相を合せ、無水硫酸ナトリウム上で乾燥し、真空下で蒸発乾固する。

得られた残留物をシリカカラム上のクロマトグ

4.6(m, CH*); 3.5(s, OCH₃);2.3(m, glu CH₂);IRスペクトル(KBr) cm⁻¹:

3,470, 3,110, 2,960, 2,600, 1,775,

1,750-1,690, 1,440, 1,410, 1,265-1,150,

1,090, 1,015, 830, 700.

実施例5:

N-マレオイル-L-イソロイシン

実施例2の手順に従い、L-イソロイシン424mg(3.22ミリモル)をN-カルボメトキシマレイミド500mg(3.2ミリモル)で処理することによりN-マレオイル-L-イソロイシンが得られる。

収率:20%。

質量スペクトル(CDI, イソブタン):

423(2M⁺+1), 352, 270,212(M⁺+1), 188, 166,

132, 123.

NMRスペクトル(CDCl₃):

8.55(肩, OH);

ラフィー(溶離:クロロホルム/酢酸、95:5)により精製する。この方法で純生成物267mgが得られる。

収率:20%。

NMRスペクトル(CD₂OD, 60MHz, ppm):

7.1(5H, m, ベンジル H);

6.6(2H, s, マレイミド db);

5(2H, s, ベンジル CH₂);3.1(2H, m, CH₂).IRスペクトル(KBr, cm⁻¹):

3060, 1765, 1745, 1720, 1410, 1270,

830, 740, 750.

実施例7:

N-マレオイル-11-アミノウンデカン酸

無水マレイン酸(2.4g, 24.8ミリモル)の酢酸10.1ml中の溶液を11-アミノウンデカン酸(5g, 24.8ミリモル)の酢酸30ml中の溶液に加え、混合物を室温で3時間激しくかくはんして維持する。

白色沈殿を濾過し、冷酢酸で洗浄し、乾燥する

(6.3 g, 21.1 ミリモル, 85%)。沈殿 3 g (1.00 ミリモル) を乾燥トルエン (300 ml) に溶解し、トリエチルアミン (2 g, 22.2 ミリモル) を加える。

溶液をデーン・アンド・スターク (Dean and Stark) 装置中で激しくかくはんしながらトルエンが蒸発するまで還流する。生成物をシリカカラム上で精製する (溶離: クロロホルム/酢酸、95:5)。この方法で N-マレオイル-11-アミノウンデカン酸 1.06 g が得られる。

収率: 37%。

NMR スペクトル (60 MHz, CDC₂, ppm):

8.8 (b p, COOH);
6.5 (2 H, s, マレイミド db);
3.4 (2 H, m, CH₂);
2.3 (2 H, m, CH₂);
1.2 (16 H, b p, 8 CH₂).

IR スペクトル (KBr, cm⁻¹):

3450, 3100, 2910, 2850, 1770, 1700, 1610,
1590, 1470, 1450, 1420, 1375, 1340, 1310.

6.52 (2 H, s, マレイミド db);
3.42 (2 H, m, CH₂);
2.3 (2 H, m, CH₂);
1.25 (18 H, ブロードピーク, 9-CH₂-)

IR スペクトル (KBr, cm⁻¹):

3450, 3080, 2920, 2825, 1770, 1470,
1450, 1440, 1415, 1380, 1340, 1300,
1260, 1250, 1205, 1120, 920, 840,
700.

実施例 9:

4-(N-マレオイル-L-アラニル)

ビンブラスチン

クロロギ酸イソブチル 1.17 ml (0.009 モル) の酢酸エチル 5 ml 中の溶液を N-マレオイルアラニン 1.52 g (0.009 モル) およびトリエチルアミン 1.25 ml (0.009 モル) の酢酸エチル 10 ml 中の 0℃ に冷却した溶液に滴加する。混合物を 1 時間 30 分 0℃ でかくはんし、酢酸エチル 20 ml 中に溶解した O'-デアセチルビンブラスチン 2.3 g (0.003 モル) を、温度

1280, 1240, 1180, 1125, 840, 700.

実施例 8:

N-マレオイル-12-アミノドデカン酸

無水マレイン酸 (2.28 g, 23.22 ミリモル) の酢酸 9.6 ml 中の溶液を 12-アミノドデカン酸 (5 g, 23.22 ミリモル) の酢酸 28 ml 中の溶液に加え、混合物を室温で 3 時間激しくかくはんして維持する。

白色沈殿を濾過し、冷酢酸で洗浄し、乾燥する (6.2 g, 20.9 ミリモル, 86%)。沈殿 4.9 g (15.9 ミリモル) を乾燥トルエン (500 ml) に溶解し、トリエチルアミン (4.9 ml, 35 分) で処理する。溶液をデーン・アンド・スターク装置中で激しくかくはんしながらトルエンが蒸発するまで還流する。生成物をシリカカラム上で精製する (溶離: クロロホルム/酢酸、95:5)。この方法で、N-マレオイル-12-アミノドデカン酸 1.38 g が得られる。

収率: 29%。

NMR スペクトル (60 MHz, CDC₂, ppm):

を 0℃ に保ちながら加える。次いで混合物を室温に戻し、10 時間かくはんする。酢酸エチル 50 ml および 10% 濃度の炭酸ナトリウム水溶液 50 ml を加える。混合物をかくはんし、有機相をデカントして分離する。水相を酢酸エチルで 3 回抽出する。有機相を合せて水溶液で洗浄し、硫酸マグネシウム上で乾燥し、真空下に蒸発乾固する。得られた残留物をシリカカラム上のクロマトグラフィー (溶離: ジクロロメタン/メタノール、92:8) により精製する。それにより純生成物 1.86 g が得られる。

収率: 67.6%。

質量スペクトル (CDI, イソブタン):

935 (M+14), 922 (M+1),
921 (M), 751, 693, 519,
445, 371, 133.

NMR スペクトル (CDCl₃, 360 MHz, ppm):

8 (NH, 1 H);
7.5 - 7 (4H, H-9', H-10', H-11', H-12');
6.7 (2 H, 酸無水物);

6.55 (1H, H-14);
 6.05 (1H, H-17);
 5.85 (1H, H-7);
 5.45 (1H, H-4);
 5.15 (1H, H-6);
 4.8 (1H, CH^{*});
 3.95 (1H, H-17');
 3.85 (3H, -OMe);
 3.78 (3H, -OMe);
 3.7 (1H, H-2);
 3.6 (3H, -OMe);
 2.7 (3H, NMe);
 1.72 (3H, アラニン CH₃);
 0.9-0.8 (6H, CH₂-21, CH₂-21').

実施例10:

4-(N-マレオイル-6-アミノカプロイル)
 ビンブラスチン

クロロギ酸イソブチル 371 μ l (2.861ミ
 リモル) の酢酸エチル 1 ml 中の溶液を N-マレ
 オイル-6-アミノカプロン酸 604 mg (2.861

1.615; 1.500; 1.460; 1.440; 1.410;
 1.370; 1.220; 1.170; 1.040.

NMR スペクトル (CDCI₃, 360 MHz, ppm):

7.47-7.12 (4H, m, H^{11'}, H^{12'}, H^{13'}, H^{14'});
 6.65 (2H, s, マレイミド db);
 6.55 (1H, s, H¹⁴);
 6.05 (1H, s, H¹⁷);
 5.82 (1H, m, H⁷);
 5.42 (1H, s, H⁴);
 5.25 (1H, m, H⁶);
 3.92 (1H, m, H^{17'});
 3.77 (6H, s, OCH₃, C²³OOCH₃);
 3.70 (1H, s, H²);
 3.6 (3H, s, C^{18'}OOCH₃);
 2.7 (3H, s, NCH₃);
 2.32 (m, アミノカプロン CH₂);
 1.62 (m, アミノカプロン CH₂);
 0.9-0.8 (6H, t, CH₂-21 + CH₂-21').

ミリモル) および N-メチルモルホリン 514 μ l
 (4.65ミリモル) の酢酸エチル 4 ml 中の 0℃
 に冷却した溶液に滴加する。混合物を 0℃で 3分
 間かくはんし、次いで酢酸エチル 1 ml に溶解し
 た O⁴-デアセチルビンブラスチン 550 mg
 (0.715ミリモル) を、温度を 0℃に保ちながら加
 える。次いで混合物を室温に戻し、10時間かく
 はんする。溶液を濾過し、酢酸エチル相を真空下
 に蒸発乾固する。得られた残留物をシリカカラム
 上のクロマトグラフィー (溶離: ジクロロメタン
 /メタノール、96:4) により精製する。それ
 により純生成物 263 mg が得られる。

収率: 23%.

質量スペクトル (DCI, イソブタン):

993; 979; 965 (M⁺ + 4);
 963 (M⁺ + 2); 961 (M⁺);
 946; 933; 920; 906;
 812; 754; 693.

IR スペクトル (KBr, cm⁻¹):

3.400; 3.050; 2.940; 1.740; 1.700;

実施例11:

4-(N-マレオイル-L-グルタミル)

ビンブラスチン γ -メチルエステル

クロロギ酸イソブチル 152 μ l (1.170ミ
 リモル) の酢酸エチル 1 ml 中の溶液を、N-マ
 レオイル-L-グルタミン酸 γ -メチルエステル
 282 mg (1.170ミリモル) およびトリエチル
 アミン 163 μ l (1.170ミリモル) の酢酸エ
 チル 1.4 ml 中の 0℃に冷却した溶液に滴加する。
 混合物を 0℃で 4分間かくはんし、次いで酢酸エ
 チル 1 ml に溶解した O⁴-デアセチルビンブラ
 スチン 300 mg (0.390ミリモル) を、温度を
 0℃に保ちながら加える。次いで混合物を室温に
 戻して 10時間かくはんする。溶液を濾過し、有
 機相を減圧下に濃縮する。得られた残留物をシリ
 カカラム上のクロマトグラフィー (溶離: エタノ
 ール/酢酸エチル、30:90) により精製する。
 それにより純生成物 222 mg が得られる。

収率: 38%.

質量スペクトル (DCI, イソブタン):

1.036, 1.022, 1.009, 995 ($M^+ + 4$),
992 ($M^+ + 1$), 937, 885, 811, 751,
694, 635, 541.

NMRスペクトル(CDC ℓ_2 , 360 MHz, ppm):

9.4 (1H, m, OH);
8 (1H, s, ind NH);
7.5-7.10 (4H, m, $H^{11'}$, $H^{12'}$, $H^{13'}$, $H^{14'}$);
6.7 (2H, s, マレイミド db);
6.58 (1H, s, H^{14});
6.05 (1H, s, H^{17});
5.80 (1H, m, H^7);
5.48 (1H, s, H^4);
5.25 (1H, m, H^6);
4.73 (1H, m, GLuCH *);
3.95 (1H, m, $H^{17'}$);
3.85 (3H, s, ar OCH $_3$);
3.75 (3H, s, C 22 OOCH $_3$);
3.63 (3H, s, C $^{18'}$ OOCH $_3$);
3.58 (3H, s, GLuOCH $_3$);
2.80 (3H, s, NCH $_3$);

2.38 (m, GLuCH $_2$);
0.9-0.8 (6H, t, CH $_3$ 21 + CH $_3$ $^{21'}$).

IRスペクトル(KBr) cm^{-1} :

3.430, 1.740, 1.715, 1.615, 1.500,
1.460, 1.430, 1.405, 1.385, 1.250,
1.225, 1.030, 1.005, 825.

実施例12:

4-(N-マレオイル-N-イソロイシル) ビンブラスチン

クロロギ酸イソブチル 92 $\mu\ell$ (0.7109ミリモル)の酢酸エチル 1 ml中の溶液を、N-マレオイル-L-イソロイシン 150 mg (0.7109ミリモル)およびトリエチルアミン 99 $\mu\ell$ (0.7109ミリモル)の酢酸エチル 1 ml中の0℃に冷却した溶液に滴加する。混合物を0℃で3分間かくはんし、次いで酢酸エチル 1 mlに溶解したO $^+$ -デアセチルビンブラスチンを、温度を0℃に保ちながら加える。次いで混合物を室温に戻し、10時間かくはんする。溶液を濾過し、酢酸エチル相を真空下に蒸発乾固する。得られた残留物をシリカ

カラム上のクロマトグラフィー(溶離:エタノール/酢酸エチル, 30:90)により精製する。それにより純生成物 133 mgが得られる。
収率: 40%。

質量スペクトル(DCI, アセトン):

1.039; 963 ($M^+ + 2$); 904; 812;
769; 728; 637; 593; 549.

IRスペクトル(KBr, cm^{-1}):

3.480-3.400; 2.960; 2.920; 2.880,
1.775; 1.740; 1.710; 1.610; 1.500;
1.460; 1.430; 1.380; 1.250; 1.220;
1.040; 1.000; 830; 740.

NMRスペクトル(CDC ℓ_2 , 360 MHz, ppm):

9.4 (m, OH);
7.5-7.1 (4H, m, arom. CH $11'$ - $12'$ - $13'$ - $14'$);
6.65 (2H, s, d マレイミド 二重結合);
6.6 (1H, s, C 14 -H);
6.05 (1H, s, C 17 -H);
5.8 (1H, s, C 7 -H);
5.45 (1H, s, C 4 -H);

5.25 (1H, m, C 6 -H);
4.5 (1H, d, C-H);
3.95 (1H, m, $H^{17'}$);
3.8 (3H, s, OCH $_3$ ar);
3.75 (3H, s, C 22 OOCH $_3$);
3.7 (1H, s, H^2);
3.6 (3H, s, C $^{18'}$ OOCH $_3$);
2.65 (3H, s, NCH $_3$);
1.1 (d, 3H, イソロイシン CH $_3$);
0.9-0.8 (9H, m, イソロイシン
CH $_3$ + CH $_3$ - $21'$ + CH $_3$ - 21).

実施例13:

4-(N-マレオイル-L-アスパルチル) ビンブラスチン α -ベンジルエステル

クロロギ酸イソブチル 114 $\mu\ell$ (0.88ミリモル)の酢酸エチル 1 ml中の溶液を、N-マレオイル-L-アスパラギン酸 α -ベンジルエステル 267 mg (0.88ミリモル)およびトリエチルアミン 118 $\mu\ell$ (0.88ミリモル)の酢酸エチル 1 ml中の0℃に冷却した溶液に滴加する。

混合物を0℃で4分間かくはんし、次いで酢酸エチル1mlに溶解したO⁴-デアセチルビンブラスチン227mg(0.29ミリモル)を、温度を0℃に保ちながら加える。次いで混合物を室温に戻して一夜かくはんする。

溶液を濾過し、有機相を減圧下に濃縮する。得られた残留物をシリカカラム上のクロマトグラフィー(溶離:エタノール/酢酸エチル, 30:90)により精製する。それにより純生成物105mgが得られる。

収率: 34%。

NMRスペクトル(CDCℓ₂, 360 MHz, ppm):

- 8.05 (1H, s, ind ¹⁴ NH);
- 7.5-7.17 (4H, m, H¹¹ H¹² H¹³ H¹⁴);
- 7.37-7.3 (5H, m, ベンジル H);
- 6.75 (2H, s, マレイミド db);
- 6.60 (1H, s, H¹⁴);
- 6.10 (1H, s, H¹⁷);
- 5.87 (1H, m, H⁷);
- 5.45 (1H, s, H⁴);

モル)の酢酸エチル1ml中の溶液を、N-マレオイル-11-アミノウンデカン酸476mg(1.69ミリモル)およびN-メチルモルホリン326μℓ(2.8ミリモル)の酢酸エチル3ml中の0℃に冷却した溶液に滴加する。混合物を0℃で3分間かくはんし、次いで酢酸エチル1mlに溶解したO⁴-デアセチルビンブラスチン433mg(0.56ミリモル)を、温度を0℃に保ちながら加える。次いで混合物を室温に戻して一夜かくはんする。

溶液を濾過し、酢酸エチル相を真空下に蒸発乾固する。得られた残留物をシリカカラム上のクロマトグラフィー(溶離:エタノール/酢酸エチル, 30:90)により精製する。それにより純生成物240mgが得られる。

収率: 41%。

NMRスペクトル(CDCℓ₂, 360 MHz, ppm):

- 8 (1H, s, ind ¹⁴ NH);
- 7.5-7.13 (4H, m, H¹¹ H¹² H¹³ H¹⁴);
- 6.68 (2H, s, マレイミド db);

- 5.30 (1H, m, H⁴);
- 5.20 (2H, m, ベンジル CH₂);
- 3.95 (1H, m, H¹⁷);
- 3.82-3.75 (6H, s, OCH₃ + COOCH₃²³);
- 3.70 (1H, s, H₂);
- 3.62 (3H, s, C¹⁸ O OCH₃);
- 2.60 (3H, s, NCH₃);
- 0.9-0.8 (6H, t, CH₃-21 + CH₃-21¹).

IRスペクトル(KBr, cm⁻¹)

- 3460, 3030, 2960, 2880, 1770, 1740,
- 1715, 1610, 1500, 1460, 1430, 1410,
- 1380, 1260, 1220, 1175, 1110, 1025,
- 910, 800, 730, 700.

質量スペクトル(DCI、イソブタン):

- 1085, 1071, 1057, 1054, 1039, 1023,
- 1013, 768, 708, 542, 158.

実施例14:

4-(N-マレオイル-11-アミノ
ウンデカノイル)ビンブラスチン

クロロギ酸イソブチル218μℓ(1.69ミリ

- 6.63 (1H, s, H¹⁴);
- 6.10 (1H, s, H¹⁷);
- 5.83 (1H, m, H⁷);
- 5.48 (1H, s, H⁴);
- 5.25 (1H, m, H⁴);
- 3.95 (1H, m, H¹⁷);
- 3.80 (6H, s, OCH₃ + C²³ O OCH₃);
- 3.73 (1H, s, H₂);
- 3.6 (3H, s, C¹⁸ O OCH₃);
- 2.7 (3H, s, NCH₃);
- 1.28 (16H, ブロードピーク, CH₂-);
- 0.88-0.8 (6H, t, CH₃-21 + δ CH₃-21¹)

IRスペクトル(KBr, cm⁻¹)

- 3430, 3040, 2930, 2860, 1770, 1735,
- 1710, 1615, 1505, 1460, 1410, 1370,
- 1230-1250, 1000-1100.

質量スペクトル(DCI、イソブタン):

- 1089, 1064, 1048, 1034, 1000,
- 990, 976, 960.

実施例 15 :

4 - (N-マレオイル-12-アミノ
ドデカノイル) ビンブラスチン

クロロギ酸イソブチル 307 μ l (2.37 ミリ
モル) の酢酸エチル 1 ml 中の溶液を、N-マレ
オイル-12-アミノドデカン酸 699 mg (2.37
ミリモル) および N-メチルモルホリン 433 μ l
(3.95 ミリモル) の酢酸エチル 4.2 ml 中の 0
℃ に冷却した溶液に滴加する。

混合物を 0℃ で 3 分間かくはんし、次いで酢酸
エチル 1 ml に溶解した O^4 -デアセチルビンブ
ラスチン 607 mg (0.79 ミリモル) を、温度を
0℃ に保ちながら加える。次いで混合物を室温に
戻して一夜かくはんする。

溶液を濾過し、酢酸エチル相を真空下に蒸発乾
固する。得られた残留物をシリカカラム上のクロ
マトグラフィー (溶離: エタノール/酢酸エチル、
30:90) により精製する。それにより純生成
物 271 mg が得られる。

収率: 33%。

質量スペクトル (DCI, イソブタン) :

1063, 1046 ($M^+ + 1$), 1037, 1028,
1016, 312, 117.

実施例 16 :

4 - (N-マレオイル-L-アラニル)
リシルビンブラスチンエチルエステル

4 - (N-マレオイル-L-アラニル) ビンブ
ラスチン 150 mg (0.163 ミリモル) のエタノ
ール 1 ml 中の溶液を、リシンエチルエステル
HCl 40.26 mg (0.163 ミリモル) およびト
リエチルアミン 150 μ l (0.978 ミリモル)
の無水エタノール 7.5 ml 中の溶液に滴加する。
混合物を室温で一夜かくはんし、次いで溶液を蒸
発させる。得られた残留物をシリカカラム上のク
ロマトグラフィー (溶離: エーテル中の 14%
MeOH/NH₃) により精製する。それにより純
生成物 101.2 mg が得られる。

収率: 67%。

質量スペクトル (DCI, イソブタン) :

1,095 ($M^+ + 2$) ; 1,094 ($M^+ + 1$) ; 1,037;

NMR スペクトル (CDCl₃, 360 MHz, ppm) :

8 (1H, s, ind ^{18'} NH) ;
7.5-7.10 (4H, m, H^{11'}, H^{12'}, H^{13'}, H^{14'}) ;
6.65 (2H, s, マレイミド db) ;
6.60 (1H, s, H¹⁴) ;
6.08 (1H, s, H¹⁷) ;
5.83 (1H, m, H⁷) ;
5.48 (1H, s, H⁴) ;
5.25 (1H, d, H⁶) ;
3.95 (1H, m, H^{17'}) ;
3.78 (6H, s, -OCH₃ + C²²OOCH₃)
3.73 (1H, s, H²) ;
3.6 (3H, s, C¹⁸OOCH₃) ;
2.7 (3H, s, NCH₃) ;
1.25 (20H, m, -CH₂-) ;
0.9-0.8 (6H, t, CH₃-21 + CH₃-21')

IR スペクトル (KBr, cm⁻¹)

3460, 3040, 2930, 2860, 1735, 1700,
1610, 1500, 1460, 1430, 1410, 1365,
1245, 1220.

921 ; 839 ; 769 ; 693 ; 615 ; 574 ; 532.

IR スペクトル (KBr) cm⁻¹ :

3,460 ; 2,940 ; 1,740 ; 1,710 ; 1,615 ;
1,500 ; 1,460 ; 1,430 ; 1,590 ; 1,250 ;
1,225 ; 1,120 ; 1,010 ; 735.

NMR スペクトル (CDCl₃, 360 MHz, ppm) :

8 (1H, NH, 16') ;
7.5-7.1 (4H, H^{11'}, H^{12'}, H^{13'}, H^{14'}) ;
6.6 (1H, s, H¹⁴) ;
6.08 (1H, s, H¹⁷) ;
5.8 (1H, m, H⁷) ;
5.45 (1H, s, H⁴) ;
5.3 (1H, m, H⁶) ;
4.8 (1H, m, CH^{*}) ;
4.18 (2H, q, -OCH₂) ;
3.83 (3H, s, OCH₃) ;
3.78 (3H, s, OCH₃) ;
3.6 (3H, s, OMe) ;
2.68 (3H, s, NCH₃) ;
1.65 (3H, d, aLa CH₃) ;

- 1.43 (2H, s) ;
 1.28 (CH₂, OCH₂CH₂) ;
 0.9-0.8(6H, CH₃-21 + CH₃-21') .

実施例 17 :

4-(N-マレオイル-L-アラニル)
 ビンブラスチンとガラクトシル化ヒト
 アルブミン (HAgal) とのカップリ
 ング、(V₄-Ala-Mal-HAg)

4-(N-マレオイル-L-アラニル) ビンブ
 ラスチン 44 mg をジオキサン 1 ml に溶解する。
 HAgal 50 mg の 0.2 M リン酸塩緩衝液 pH 8.5、
 5 ml 中の溶液を別個に調製する。4-(N-マ
 レオイル-L-アラニル) ビンブラスチンの溶液
 を HAgal の溶液に加える。混合物を室温で一
 夜かくはんし、0.9%濃度の NaCl 溶液 pH 7.5 に平
 衡させたセファデックス (Sephadex) G-25
 (2.6 × 96 cm) 上のゲル濾過により精製する。
 排出ピークを捕集し (96 ml)、限外濾過によ
 り濃縮し、滅菌する。

タンパク質含量をローリー法により測定し、ア

放射能の測定により評価する。得られた結合体は
 ガラクトシル化ヒトアルブミン毎分子 12.7 モル
 のアルカロイドを含む。

実施例 19 :

4-(N-マレオイル-L-グルタミル)
 ビンブラスチンγ-メチルエステルとガラ
 クトシル化ヒトアルブミン (HAgal) と
 のカップリング、
(V₄-GLuγME-Mal-HAg)

4-(N-マレオイル-L-グルタミル) ビン
 ブラスチンγ-メチルエステル 24 mg をジオキサ
 ン 1 ml に溶解する。HAgal 50 mg の 0.2 M リ
 ン酸塩緩衝液 pH 8.5、5 ml 中の溶液を別個に調
 製する。4-(N-マレオイル-L-グルタミル)
 ビンブラスチンγ-メチルエステルの溶液を
 HAgal の溶液に加える。混合物を室温で一
 夜かくはんし、0.9%濃度の NaCl 溶液 pH 7.5 に平
 衡させたセファデックス G-25 (2.6 × 96 cm)
 上のゲル濾過により精製する。排出ピークを捕集
 し、(100 ml)、限外濾過により濃縮し、滅

菌する。タンパク質含量をローリー法により測定
 し、アルカロイド含量を放射能の測定により評価
 する。結合体はガラクトシル化ヒトアルブミン
 毎分子 13.5 モルのアルカロイドを含む。

実施例 18 :

4-(N-マレオイル-6-アミノカプロイル)
 ビンブラスチンとガラクトシル化ヒトアルブ
 ミン (HAgal) とのカップリング、
(V₄-Cap-Mal-HAg)

4-(N-マレオイル-6-アミノカプロイル)
 ビンブラスチン 234 mg をジオキサン 1 ml に溶
 解する。HAgal 50 mg の 0.2 M リン酸塩緩衝液
 pH 8.5、5 ml 中の溶液を別個に調製する。4-
 (N-マレオイル-6-アミノカプロイル) ビン
 ブラスチンの溶液を HAgal の溶液に加える。混
 合物を室温で一晩かくはんし、次いで 0.9%濃度
 の NaCl 溶液 pH 7.5 に平衡させたセファデックス
 G-25 (2.6 × 96 cm) 上のゲル濾過により精
 製する。排出ピークを捕集し (100 ml)、限
 外濾過により濃縮し、滅菌する。タンパク質含量
 をローリー法により測定し、アルカロイド含量を

測定する。タンパク質含量をローリー法により測定
 し、アルカロイド含量を放射能の測定により評価
 する。結合体はガラクトシル化ヒトアルブミン毎
 分子 11.8 モルのアルカロイドを含有する。

実施例 20 :

4-(N-マレオイル-L-イソロイシル)
 ビンブラスチンとガラクトシル化ヒトアル
 ブミン (HAgal) とのカップリング、
(V₄-Ile-Mal-HAg)

4-(N-マレオイル-L-イソロイシル) ビ
 ンブラスチン 250 mg をジオキサン 20 ml に溶解
 する。

HAgal 591 mg の 0.4 M リン酸塩緩衝液 pH
 8.5、16.5 ml 中の溶液を別個に調製する。

4-(N-マレオイル-L-イソロイシル) ビ
 ンブラスチンの溶液を HAgal の溶液に加える。
 混合物を室温で一晩かくはんし、0.9%濃度の
 NaCl 溶液 pH 7.5 に平衡させたセファデックス G
 -25 (2.6 × 96 cm) 上のゲル濾過により精製
 する。排出ピークを捕集し (180 ml)、限外

濾過により濃縮し、滅菌する。

タンパク質含量をローリー法により測定し、アルカロイド含量を放射能の測定により評価する。

得られた結合体はガラクトシル化ヒトアルブミン毎モル8.8モルのアルカロイドを含有する。

実施例21:

4-(N-マレオイル-L-アスパルチル)ビンブラスチン α -ベンジルエステルとガラクトシル化ヒトアルブミン(HAga ℓ)とのカップリング、

(V₄-Asp α BE-Ma ℓ -HAga)

4-(N-マレオイル-L-アスパルチル)ビンブラスチン α -ベンジルエステル105mgをジオキサン7.9mlに溶解する。

HAga ℓ 226mgの0.4Mリン酸塩緩衝液pH8.5、6.3ml中の溶液を別個に調製する。

4-(N-マレオイル-L-アスパルチル)ビンブラスチンベンジルエステルの溶液をHAga ℓ の溶液に加える。混合物を室温で一夜かくはんし、0.9%濃度のNaCl溶液pH7.5に平衡させたセフ

に加える。混合物を40℃で5時間かくはんし、0.9%濃度のNaCl溶液pH7.5に平衡させたトリスアクリル(Trisacryl)(5.6×50cm)上のゲル濾過により精製する。排出ピークを捕集し(250ml)、限外濾過により濃縮し、滅菌する。

タンパク質含量をローリー法により測定し、アルカロイド含量を放射能の測定により評価する。

得られた結合体はガラクトシル化ヒトアルブミン毎モル10.2モルのアルカロイドを含有する。

実施例23:

4-(N-マレオイル-12-アミノドデカノイル)ビンブラスチンとガラクトシル化ヒトアルブミン(HAga ℓ)とのカップリング、

(V₄-C₁₂-Ma ℓ -HAga)

4-(N-マレオイル-12-アミノドデカノイル)ビンブラスチン120mgをジオキサン16mlに溶解する。

HAga ℓ 339mgの0.4Mリン酸塩緩衝液pH

7.5(2.6×96cm)上のゲル濾過により精製する。排出ピークを捕集(60ml)し、限外濾過により濃縮し、滅菌する。

タンパク質含量をローリー法により測定し、アルカロイド含量を放射能の測定により評価する。

得られた結合体はガラクトシル化ヒトアルブミン毎モル5.7モルのアルカロイドを含有する。

実施例22:

4-(N-マレオイル-11-アミノウンデカノイル)ビンブラスチンとガラクトシル化ヒトアルブミン(HAga ℓ)とのカップリング、

(V₄-C₁₁-Ma ℓ -HAga)

4-(N-マレオイル-11-アミノウンデカノイル)ビンブラスチン440mgをジオキサン46mlに溶解する。

HAga ℓ 969mgの0.4Mリン酸塩緩衝液pH8.5、27ml中の溶液を別個に調製する。

4-(N-マレオイル-11-アミノウンデカノイル)ビンブラスチンの溶液をHAga ℓ の溶液

8.5、9.4ml中の溶液を別個に調製する。

4-(N-マレオイル-12-アミノドデカノイル)ビンブラスチンの溶液をHAga ℓ の溶液に加える。混合物を40℃で6時間かくはんし、0.9%濃度のNaCl溶液pH7.5に平衡させたトリスアクリル(5.6×50cm)上のゲル濾過により精製する。排出ピーク(240ml)を捕集し、限外濾過により濃縮し、滅菌する。

タンパク質含量をローリー法により測定し、アルカロイド含量を放射能の測定により評価する。得られた結合体はガラクトシル化ヒトアルブミン毎モル9モルのアルカロイドを含有する。

実施例24:

4-(N-マレオイル)-L-アラニルビンブラスチンと非特異的免疫グロブリン(IgG)とのカップリング、

(V₄-Ala-Ma ℓ -IgG)

4-(N-マレオイル)-L-アラニルビンブラスチン4mgをエタノール193 μ lに溶解する。一方、リン酸塩緩衝液0.4M、pH8.5、357 μ l

および水 447 μ l 中の IgG 10 mg (626 μ l) の溶液 (7 mg prot / 1 ml) を調製する。4-(N-マレオイル)-L-アラニルビンブラスチンの溶液を IgG 溶液に加える。混合物を 35℃ で一夜かくはんし、リン酸塩緩衝液 0.2 M、pH 7.5 中で平衡させたデュボン (DuPont de Nemours) GF 450 + 250 のカラム上の HPLC (ゲル濾過) により精製する。

排出ピークを捕集し、量を測定する。

タンパク質含量をローリー法により測定し、アルカロイド含量を放射能の測定により評価する。得られた結合体は免疫グロブリン毎モル 6.6 モルのアルカロイドを含有する。

本発明の化合物を薬理学的研究に供した。

(1) リソソーム酵素に対する感受性

結合体のリソソーム酵素に対する感受性は、これらの結合体を 37℃ で 48 時間、5 mM のリソソーム、40 mM の酢酸塩緩衝液およびリソソーム酵素の存在下に培養することにより調べた。

ロロ酢酸 (40% 濃度 TCA) 1 容積の添加により沈殿させる。試料を 4℃ で 1 時間培養後、後者を遠心分離し、上澄みの放射能をアリコート部分の液体シンチレーション計数により評価する。

可溶物放射能は結合体の消化の尺度である。

結果は結合体が 48 時間中安定であることを示す。

(3) 酸性 pH における安定性

酸性 pH における結合体の安定性を、結合体を 40 mM 酢酸塩緩衝液 pH 4.5 の存在下に 37℃ で 48 時間培養することにより調べた。消化は TCA 沈殿法により評価する。

結果は結合体がこれらの条件のもとで安定であることを示す。

(4) 白血病 P 388 に対する化学療法活性

中間誘導体および結合体の化学療法活性を、メス BDF₁ マウスに ip 投与した白血病 P 388 について評価した：10⁶ 腫瘍細胞を 0 日に ip 接種する。結合体は第 1 日に ip 投与する。

48 時間の培養後血清アルブミン 5 mg をアセトニトリル 2 容量とともに加えた後非分解タンパク質を沈殿させる。

試料を 4℃ で 40 分間培養し、3,000 rpm で 40 分間遠心分離した後、上澄みの放射能をアリコート部分の液体シンチレーション計数により評価する。可溶物放射能は結合体の消化の尺度である。

得られた消化パーセントの値は次のとおりである。

V₄-Ala-Mal-HAg : 92%

V₄-C₄-Mal-HAg : 100%

V₄-Ile-Mal-HAg : 75%

V₄-C₁₁-Mal-HAg : 79%

V₄-C₁₂-Mal-HAg : 92%

(2) 血清中の安定性

結合体の血清存在下の安定性を、結合体を 62% ウシ胎児血清の存在下に 37℃ で 48 時間培養することにより調べた。

48 時間の培養後非分解タンパク質をトリク

ILS 値は非処置マウスの生存期間と比較した処置マウスの生存期間パーセントを示す。

モル比はガラクトシル化ヒトアルブミン毎モル当りのアルカロイドのモル数を示す。

第 60 日におけるマウス生存数並びにアルカロイドおよびタンパク質の mg/kg における用量が示される。

3. 2 結 合 体

3. 1 中 間 誘 導 体

生 成 物	用 量 mg/kg/日	I L S %	生 存 数 第 6 0 日
VBL (ビンブラスチン)	3	77	0/10
VCR (ビンクリスチン)	2.7	64	0/11
V ₄ -Ala-Mal (実施例 9)	2.5	100	0/7
	5.0	127	0/7
	7.5	-70	0/6
V ₄ -Glu γ ME-Mal (Ex 11)	5.0	88	0/10
	10.0	111	0/10
V ₄ -Ile-Mal (実施例12)	5.0	148	0/7
	10.0	-79	0/7
V ₄ -C ₆ -Mal (実施例10)	2.5	102	0/8
	5.0	218	1/7
	10.0	-83	0/7
V ₄ -C ₁₁ -Mal (実施例14)	5.0	37	1/7
	10.0	-19	1/5
V ₄ -C ₁₈ -Mal (実施例15)	2.5	185	1/5
	5.0	>633	6/8
	10.0	7	1/7

生 成 物	用 量 mg/kg/日 ビンカ	タンパク質	モル比	I L S %	生 存 数 第 6 0 日
VBL	3			77	0/10
VCR	2.7			64	0/11
V ₄ -Ala-Mal-HAg	60	374-466	13.5-10.7	69	0/5
	80	450	15	133	1/5
	100	562	15	201	0/5
	130	2766	6.6	175	1/3
	150	3035	4.1	138	0/7
	150	1276	9.8	>552	3/5
	150	913	13.7	>574	3/5
V ₄ -Asp α BE-Mal-HAg	60	768	5.7	47	0/5
V ₄ -Glu γ ME-Mal-HAg	60	987	4.7	67	0/5
	100	1645	4.7	75	0/5
	150	2468	4.7	88	0/5
V ₄ -Ile-Mal-HAg	60	545	8.8	51	0/5
	100	908	8.8	48	0/5
	150	1362	8.8	79	0/5
V ₄ -C ₆ -Mal-HAg	60	400	12	95	0/5
	150	995	12	137	1/5
V ₄ -C ₁₁ -Mal-HAg	60	378	11.8	147	1/5
	80	504	11.8	153	1/5
		753	7.9		
	90	658	10.2	227	
	100	630	11.8	>606	3/5
	100	646	7.9	186	3/10
	150	945	11.8	-45	0/5
V ₄ -C ₁₈ -Mal-HAg	90	741	9	>769	5/5

第1頁の続き

⑤Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

A 61 K 39/00

7252-4C

C 07 K 3/08

8318-4H

15/12

優先権主張

②1986年7月16日③ルクセンブルグ(LU)④86515

⑦発 明 者

カンドウクリ シヴァ ベルギー国 ベー1331 ロジェール リュー クワケンビ
プラサダ ブシヤナ アンヌ 11
ラオ

手続補正書(方式)

62.3.13

昭和 年 月 日

特許庁長官 殿



1. 事件の表示 昭和61年特許願第299788号

2. 発明の名称 ビンプラスチックおよびその誘導体の新規結合体、その製造方法、並びにそれを含む製剤組成物

3. 補正をする者

事件との関係 出願人

名称(氏名) オムニケム

4. 代理人

住所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号
電話(代) 211-6741

氏名 (5995) 弁理士 中村 稔



5. 補正命令の日付 昭和62年2月24日

6. 補正の対象

願書の出願人の欄
代理権を証明する書面
明細書



7. 補正の内容

別紙のとおり

願書に最初に添付した明細書の浄書
(内容に変更なし)

方式
審査

